

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：63801
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570218
 研究課題名（和文） 脊椎動物新奇付属器官の発生を制御するDlx3遺伝子コオプション進化機構の解明
 研究課題名（英文） ANALYSIS OF EVOLUTIONARY MECHANISM OF DLX3 GENE CO-OPTION IN DEVELOPMENT OF NOVEL APPENDAGES OF VERTEBRATES.
 研究代表者
 隅山 健太（SUMIYAMA KENTA）
 国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教
 研究者番号：00370114

研究成果の概要（和文）： Dlx3-4 遺伝子組織特異的エンハンサー解析により（1）鰓弓特異的発現を引き起こすシス配列 I37-2 のコア配列がカモノハシにまで見いだされ有胎盤類への進化の過程で鰓弓機能を獲得したことを示した（2）四肢および毛包に発現活性を持つシス配列 I37-1 の起源はナメクジウオとの分岐以前にまで遡り、BMP 反応性のシス配列コアモチーフがコオプションによって四足動物で新たに四肢や毛包の発生過程で獲得されたことを示した。

研究成果の概要（英文）： Through Dlx3-4 gene enhancer analysis, we found that (1) the core element of brachial arch enhancer I37-2 was conserved between mice and platypus, and branchial arch activity was acquired in placental mammal lineage. (2) I37-1 that shows limbs and hair follicles enhancer activities is quite ancient, conserved even in amphioxus. The core motif plays an important role in Dlx3 gene co-option in development of limbs and hair follicles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：遺伝子進化、シスエレメント進化

1. 研究開始当初の背景

同一の発生調節遺伝子が新奇付属器官での新しい発現を獲得することで、既存の機能に加えて新機能を獲得すること（遺伝子の co-option）が、脊椎動物のボディプラン進化において重要なステップであることが提唱されている。遺伝子の co-option を可能にするためには新規の cis-element が獲得されることがまず必要であるが、脊椎動物の遺伝子の co-option 進化において

cis-element の機能進化とゲノムレベルでの分子進化を併せて詳細に解析した例はなく、そのような研究が求められていた。

近年の脊椎動物ゲノム研究によれば、遺伝子の総数はボディプランの複雑さとはあまり関係なく一定（2万前後）であることから、脊椎動物のボディプランの進化には、新遺伝子の出現よりもむしろ既存の重要発生関連遺伝子を新奇付属器官で使い回すこと（遺伝子の co-option）の方により重要な

意義があることが示唆されている。実際に **Dlx** 遺伝子をはじめとする **toolkit** 遺伝子と呼ばれる発生制御遺伝子は多くの動物に共通に保持されていて、共通の古い機能に加えそれぞれの動物固有の新しい機能を獲得していることがわかっている。しかしながら脊椎動物での発生調節 **toolkit** 遺伝子の **co-option** 研究に欠かせない遺伝子発現調節領域 (**cis-element**) の機能と進化については、主に技術的な困難から深く研究されていないのが実情であった。

2. 研究の目的

Dlx3 遺伝子はもともと神経板境界決定因子であったが、脊椎動物の進化の初期に顎と足を獲得した際に発現を獲得し、さらに哺乳類への進化に際して体毛と胎盤に発現を獲得するなど、遺伝子の **co-option** 研究に最適のモデル系である。この研究計画では **Dlx3** 遺伝子の **cis-element** の機能的・進化的解析により、**co-option** の遺伝的・進化的メカニズムを解明することを目的とする。

Dlx3 遺伝子はこのような遺伝子の **co-option** 進化を可能にした遺伝的・分子的メカニズムを研究するのに最適なモデル系である。**Dlx3** の脊椎動物祖先での発現場所は神経板境界で、神経・非神経上皮組織の運命を決定する重要な機能を持っていた。**Dlx3** は哺乳類では新奇付属器官での発現を多数獲得している。代表的な **Dlx3** 発現組織は顎、四肢、胎盤、毛胞であり、このうち顎、胎盤、毛胞では **Dlx3** の機能欠損により重大な発生障害が起きることから、これらの組織の発生を上位で制御する重要な遺伝子であることがわかっている。これらの新奇付属器官での発現を **Dlx3** が進化の過程でどのように獲得してきたのか、どのような分子機構が新奇発現を可能にしたのかを知るためには、**Dlx3** の発現調節機構を知ることが必須である。しかしながら哺乳類胎児での遺伝子発現調節機構の研究には困難が多く、これまでに世界的に見ても **Dlx3** についての発現調節機構の研究がほとんどなかった。

3. 研究の方法

本研究計画では多様な脊椎・脊索動物種の **Dlx3-4** クラスターのエンハンサー配列を用いて、バイオインフォーマティクス解析により推定した組織特異的 **cis-element** モチーフに塩基置換を導入してモチーフを欠損させたエンハンサーを全てのモチーフについて作製し、高効率トランスジェニックマウス解析によりその組織特異性の検討を行う。この実験により各組織特異的な転写制御を決定しているモチーフを確定する。この一連の実験結果によって祖先的な **cis-element** がどのようにして新しい機能

を持つ **cis-element** へと進化したのかを遺伝学的に明らかにすることが期待できる。具体的には、比較ゲノムによる高精度な **cis-element** 予測法と、酵母相同組換え系による大規模 PAC クローンを用いたトランスジェニックマウス解析を応用し、**Dlx3** の顎、四肢、体毛の **cis-element** を決定する。さらに、従来の 10 倍の効率でトランスジェニックマウスを作製できる Tol2 トランスポゼースを用いた新しいトランスジェニックマウス作製法を開発できたので、今回の研究計画ではこれを **Dlx3** の **cis-element** 機能解析に応用することで研究の進展を早めることが期待できる。

4. 研究成果

エンハンサー候補配列コンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを Tol2 トランスポゾンシステムによる細胞質注入法で作製し、生まれたマウスを系統化し、F1 世代の発現解析をそれぞれ行った。この結果、(1) 鰓弓特異的発現を引き起こす配列 I37-2 の活性を担う中心は **Dlx** 転写因子が結合する配列であることを確認し、このコア配列が進化的にも起源が古く、カモノハシにまで見いだされることを示し、さらにそのカモノハシ配列をトランスジェニックマウスで活性を解析したところ、コア配列の保存性にもかかわらず、鰓弓での発現活性は未だ備えていなかったことが明らかになった (図 1)。また **Dlx4** 遺伝子のコード領域にも有胎盤類に固有の変異が発見された (図 2)。 **Dlx4** 遺伝子は胎盤形成に重要な役割を持つと考えられ、胎盤獲得のための正淘汰進化であったと考えられる。以上は *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 誌に発表した (Sumiyama et al. 2012)。

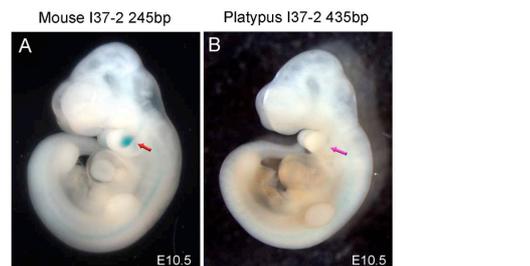


図 1 有胎盤類の I37-2 エンハンサーは鰓弓に活性があるが、カモノハシの配列は鰓弓に活性を持たない。

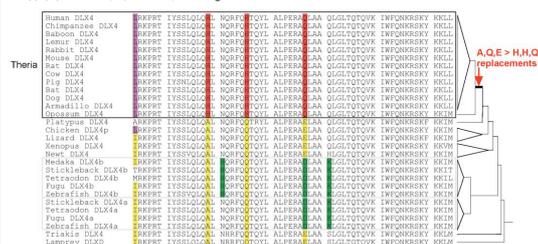


図2 Dlx4 遺伝子のホメオドメインに見いだされた有胎盤類固有アミノ酸変異。

(2) 四肢および毛包に発現活性を持つシス配列 I37-1 は大変起源が古く、四肢や毛包の起源より遙か以前、ナメクジウオとの分岐以前にまで遡る。このコア配列を含むナメクジウオ配列のエンハンサー活性をトランスジェニックマウスで調べたところ、神経板前方境界に特に強く発現活性を持つことがわかった。進化学的な解析から活性中心とみられた高度保存配列である BMP 反応性のシス配列モチーフ GGCTCCAGCTAGTCTG に欠失変異を導入したトランスジェニックマウスでは、この神経板前方境界の特に強い発現活性が完全に失われていた。マウス由来 i37-1 配列においても高度保存 BMP 反応性シス配列モチーフの欠失は四肢での活性を失うことが示されている(図3) ことから、このモチーフがコオプシオンによって四足動物で新たに四肢や毛包を発生過程で働く役割を持つようになったという進化的なストーリーが明らかになった(図4)。以上について現在投稿論文作成中である。

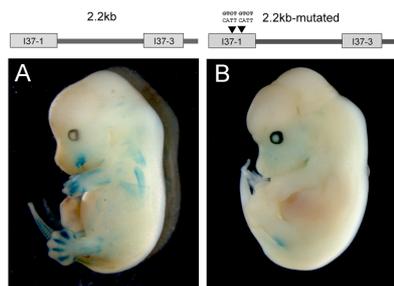


図3 保存のコア配列である BMP 反応モチーフは四肢の発現に必須である。

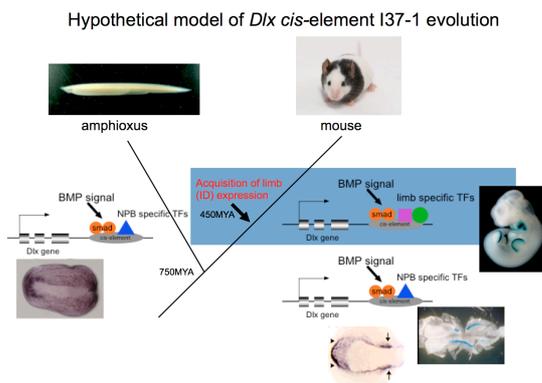


図4 エンハンサー進化と Dlx3-4 遺伝子 co-option の進化モデル。

(3) 本研究で確立したエンハンサー解析技術を応用することで、メダカ変異の原因因子

のエンハンサー解析を共著者として行った (Moriyama et al. 2012)。

(4) 本研究で確立したエンハンサー解析技術を応用することで、シーラカンスのトランスポゾン由来配列の解析を共著者として行った (Smith et al. 2012)。

(5) 本研究で確立したエンハンサー解析技術を応用することで、ヒト特異的エンハンサー変異の機能解析を行い、従来のヒト特異的変異配列 HACNS1 の進化原因についての論争に重要な証拠を加えることができた (Sumiyama and Saitou 2011)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Kenta Sumiyama, Tsutomu Miyake, Jane Grimwood, Andrew Stuart, Mark Dickson, Jeremy Schmutz, Frank H. Ruddle, Richard M. Myers, and Chris T. Amemiya. "Theria-specific homeodomain and cis-regulatory element evolution of the Dlx3-4 bigene cluster in 12 different mammalian species." *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. (2012) 318 (8), 639-650. DOI: 10.1002/jez.b.22469 査読有

② Yuuta Moriyama, Toru Kawanishi, Ryohei Nakamura, Tatsuya Tsukahara, Kenta Sumiyama, Maximiliano L. Suster, Koichi Kawakami, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Yuuri Yasuoka, Yusuke Nagao, Etsuko Sawatari, Atsushi Shimizu, Yuko Wakamatsu, Masahiko Hibi, Masanori Taira, Masataka Okabe, Kiyoshi Naruse, Hisashi Hashimoto, Atsuko Shimada, and Hiroyuki Takeda. "The Medaka *zic1/zic4* Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution." *Current Biology* (2012) 22(7), 601-607. doi: 10.1016/j.cub.2012.01.063. 査読有

③ Jeremiah J. Smith, Kenta Sumiyama and Chris T. Amemiya. "A living fossil in the genome of a living fossil: Harbinger transposons in the coelacanth genome" *Molecular Biology and Evolution* (2012) 29(3), 985-993. doi: 10.1093/molbev/msr267. 査読有

④ Kenta Sumiyama and Naruya Saitou.
"Loss-of-function mutation in a repressor
module of human-specifically activated
enhancer HACNS1."
Molecular Biology and Evolution (2011)
28(11), 3005-3007.
doi: 10.1093/molbev/msr231. 査読有

なし

[学会発表] (計 13 件)

① Kenta Sumiyama "Evolution of
Cis-regulatory Elements in the Vertebrate
Dlx Bigene Cluster System" Symposium of
Genomic Conservation and Diversity of
Organisms ~Beyond the NGS time of Life
Science~, 2011 年 12 月 10 日, Tainan,
Taiwan.

② Kenta Sumiyama "Theria-specific
evolution in both coding and noncoding
region of the Dlx4 gene." Annual Meeting
for the Society for Molecular Biology and
Evolution (SMBE 2011), 2011 年 7 月 27 日, 京
都

③ Kenta Sumiyama "Functional evaluation
of cis-regulatory elements and their
evolution in the vertebrate Dlx3-7 bigene
cluster." NAIST Global COE International
Symposium 2010: Plasticity in Development
and Evolution, 2010 年 11 月 11 日, 奈良

[図書] (計 2 件)

① 隅山健太、川上浩一 <series モデル
動物利用マニュアル> 生物機能モデルと新
しいリソース・リサーチツール 第 6 節 新
しい生殖工学技術 第 4 項 トランスポゾ
ンを使った 新しい高効率トランスジェニッ
クマウス作製法 pp.656-658 (2011) エ
ル・アイ・シー

[その他]

ホームページ等
研究者ホームページ (研究内容紹介)
<http://sayer.lab.nig.ac.jp/~sumiyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隅山 健太 (SUMIYAMA KENTA)
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教
研究者番号： 00370114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者